

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/40016 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/27

(74) Mandataire : **BOURGOUIN, André**; Beaufour Ipsen -
S.C.R.A.S., Direction de la Propriété Industrielle, 24, rue
Erlanger, F-75781 Paris Cedex 16 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/03558

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international :
14 novembre 2001 (14.11.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/14690 15 novembre 2000 (15.11.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
**SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.)**
[FR/FR]; Société par Actions Simplifiée, 51-53, rue du
Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
CHABRIER DE LASSAUNIERE, Pierre-Etienne
[FR/FR]; 134, quai Louis Blériot, F-75016 Paris (FR).
PIGNOL, Bernadette [FR/FR]; 39 rue de Pommard,
F- 75012 Paris (FR). **AUVIN, Serge** [FR/FR]; 4, rue
Chanteclair, F-91730 Mauchamps (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: ASSOCIATION OF CALPAIN INHIBITORS AND REACTIVE OXYGEN SPECIES TRAPPING AGENTS

(54) Titre : ASSOCIATION D'INHIBITEURS DE CALPAÏNE ET DE PIEGEURS DES FORMES REACTIVES DE L'OXY-
GENE

(57) Abstract: The invention concerns a pharmaceutical composition comprising, as active principle, at least a calpain inhibiting substance and at least a substance trapping reactive oxygen species (ROS), and optionally an acceptable pharmaceutical carrier. The invention also concerns a product comprising at least a calpain inhibiting substance and at least a substance trapping reactive oxygen species (ROS), selectively or not, as combination product, the active principle being separate.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène (ROS pour "reactive oxygen species"), et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable. L'invention concerne également un produit comprenant au moins une substance inhibitrice de calpaïnes et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, de manière sélective ou non, en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, de ces principes actifs.

WO 02/40016 A2

**Association d'inhibiteurs de calpaïne et
de piègeurs des formes réactives de l'oxygène**

La présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène (ROS pour "*reactive oxygen species*"), et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable. L'invention concerne également un produit comprenant au moins une substance inhibitrice de calpaïnes et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène, de manière sélective ou non, en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, de ces principes actifs.

Compte tenu du rôle potentiel des calpaïnes et des ROS en physiopathologie, une composition selon l'invention peut produire des effets bénéfiques ou favorables dans le traitement de pathologies où ces enzymes et / ou ces espèces radicalaires sont impliquées, et notamment :

- les maladies inflammatoires et immunologiques comme par exemple l'arthrite rhumatoïde, les pancréatites, la sclérose en plaques, les inflammations du système gastro-intestinal (colite ulcéreuse ou non, maladie de Crohn),
- 15 - les maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires comprenant par exemple l'hypertension artérielle, le choc septique, les infarctus cardiaques ou cérébraux d'origine ischémique ou hémorragique, les ischémies ainsi que les troubles liés à l'agrégation plaquettaire,
- 20 - les troubles du système nerveux central ou périphérique comme par exemple les maladies neurodégénératives où l'on peut notamment citer les traumatismes cérébraux ou de la moëlle épinière, l'hémorragie sub arachnoïde, l'épilepsie, le vieillissement, les démences séniles, y compris la maladie d'Alzheimer, la chorée de Huntington, la maladie de Parkinson, les neuropathies périphériques,
- l'ostéoporose,
- 25 - les dystrophies musculaires, la cachexie,
- les maladies prolifératives comme par exemple l'athérosclérose ou la resténose,
- la perte d'audition,

- la cataracte,
- les transplantations d'organes,
- les maladies auto-immunes et virales comme par exemple le lupus, le sida, les infections parasitaires et virales, le diabète et ses complications, la sclérose en plaques,
- 5 - le cancer,
- toutes les pathologies caractérisées par une production excessive des ROS et / ou une activation des calpaïnes.

Dans l'ensemble de ces pathologies, il existe des évidences expérimentales démontrant l'implication des ROS (Free Radic. Biol. Med. (1996) 20, 675-705 ; Antioxid. Health. Dis. (1997) 4 (Handbook of Synthetic Antioxidants), 1-52) ainsi que l'implication des calpaïnes (Trends Pharmacol. Sci. (1994) 15, 412419 ; Drug News Perspect (1999) 12, 73-82). A titre d'exemple, les lésions cérébrales associées à l'infarctus cérébral ou au traumatisme crânien expérimental sont réduites par des agents antioxydants (Acta. Physiol. Scand. (1994) 152, 349-350 ; J. Cereb. Blood Flow Metabol. (1995) 15, 948-952 ; J Pharmacol Exp Ther (1997) 2, 895-904) ainsi que par des inhibiteurs de calpaïnes (Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93, 3428-33 ; Stroke, (1998) 29, 152-158 ; Stroke (1994) 25, 2265-2270). Aucune association à but thérapeutique de ces deux principes actifs, à savoir une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, n'a été décrite dans la littérature. De plus ces deux principes actifs agissent de façon synergique.

La présente invention a donc pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable. Dans la présente demande, l'expression " au moins une substance inhibitrice de calpaïnes et au moins une substance piègeurs de radicaux libres" signifie l'association d'au moins deux entités différentes, l'une inhibiteur de calpaïnes et l'autre piègeurs de radicaux libres.

La présente invention a plus particulièrement pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.

- la cataracte,
- les transplantations d'organes,
- les maladies auto-immunes et virales comme par exemple le lupus, le sida, les infections parasitaires et virales, le diabète et ses complications, la sclérose en plaques,
- 5 - le cancer,
- toutes les pathologies caractérisées par une production excessive des ROS et / ou une activation des calpaïnes.

Dans l'ensemble de ces pathologies, il existe des évidences expérimentales démontrant l'implication des ROS (Free Radic. Biol. Med. (1996) 20, 675-705 ; Antioxid. Health. Dis. (1997) 4 (Handbook of Synthetic Antioxidants), 1-52) ainsi que l'implication des calpaïnes (Trends Pharmacol. Sci. (1994) 15, 412-419 ; Drug News Perspect (1999) 12, 73-82). A titre d'exemple, les lésions cérébrales associées à l'infarctus cérébral ou au traumatisme crânien expérimental sont réduites par des agents antioxydants (Acta. Physiol. Scand. (1994) 152, 349-350 ; J. Cereb. Blood Flow Metabol. (1995) 15, 948-952 ; J Pharmacol Exp Ther (1997) 2, 895-904) ainsi que par des inhibiteurs de calpaïnes (Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93, 3428-33 ; Stroke, (1998) 29, 152-158 ; Stroke (1994) 25, 2265-2270). Aucune association à but thérapeutique de ces deux principes actifs, à savoir une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, n'a été décrite dans la littérature. De plus ces deux principes actifs agissent de façon synergique.

La présente invention a donc pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable. Dans la présente demande, l'expression " au moins une substance inhibitrice de calpaïnes et au moins une substance piègeurs de radicaux libres" signifie l'association d'au moins deux entités différentes, l'une inhibiteur de calpaïnes et l'autre piègeurs de radicaux libres.

La présente invention a plus particulièrement pour objet une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.

Dans le terme piègeur de formes réactives de l'oxygène, il faut comprendre toute substance chimique ou enzymatique capable de s'opposer ou de piéger les ou l'une des formes réactives de l'oxygène telles que $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} , $ONO_2^{\cdot -}$, NO^{\cdot} , NO_2^{\cdot} ou H_2O_2 (Halliwell B., Gutteridge JMC., Free radicals in biology and medicine, 2nd ed., Oxford, Clarendon Press, 1989). Ces substances peuvent être naturelles ou synthétiques et posséder des propriétés antioxydantes. (Santrucek and Krepelka, Antioxidants - Potential chemotherapeutic agents Drugs Future 13, 975-996, 1988 ; Jackson et al, Antioxidants : a biological defense mechanism for the prevention of atherosclerosis, Med. Res. Reviews 13, 161-182 (1993) ; Aruoma, Characterization of drugs as antioxidant prophylactics, Free Rad. Biol. Med. 20, 675-705 (1996)). L'activité anti-oxydante d'une substance chimique peut être déterminée par des tests pharmaceutiques classiques tels que ceux illustrés dans la partie expérimentale de la présente demande. Une telle substance anti-oxydante peut ainsi présenter, sur la peroxydation lipidique (cf test dans la partie expérimentale de la présente demande), une CI_{50} inférieure à 100 μM et de préférence inférieure à 10 μM .

Les calpaïnes sont des enzymes cytosoliques protéolytiques qui appartiennent à la famille des cystéines protéases. L'activation des calpaïnes est strictement dépendante du calcium (Suzuki et al. Calpain : Novel family members, activation, and physiological function (1995) Biol.Chem, Hoppe-Seyler, 376, 523-529). Dans des conditions physiologiques normales, ces enzymes ne sont pas ou peu activées. Au contraire l'élévation excessive de calcium intracellulaire qui est observée dans certains phénomènes physiopathologiques induit une forte activation des calpaïnes. Cette activation entraîne le clivage sélectif et par conséquent la perte de fonction de protéines du cytosquelette, de récepteur membranaire ou de facteurs de transcription conduisant à la mort cellulaire et à la dégradation des tissus. L'activation des calpaïnes apparaît jouer un rôle majeur et délétère dans plusieurs pathologies comme par exemple les maladies neurodégénératives, l'ischémie cérébrale ou les dystrophies musculaires, que pourraient éventuellement corriger des inhibiteurs de ces enzymes (Wank K et al. Calpain inhibition : an overview of its therapeutical potential (1994) Trends in Pharmacological Sciences 15, 412-419). L'activité inhibitrice d'une substance chimique vis à vis des calpaïnes peut être déterminée par des tests pharmaceutiques classiques tels que ceux illustrés dans la partie expérimentale de la présente demande. Une telle substance inhibitrice de calpaïne peut ainsi présenter, sur l'inhibition de la calpaïne (cf test dans la partie expérimentale de la présente demande), une CI_{50} inférieure à 10 μM .

L'invention a également pour objet un produit comprenant au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, pour une utilisation simultanée ou séquentielle dans le traitement de pathologies dans lesquelles les calpaïnes et les formes réactives de l'oxygène sont impliquées, pathologies telles que les maladies inflammatoires et immunologiques, les maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires, les troubles du système nerveux central, l'ostéoporose, les dystrophies musculaires, la cachexie, la perte d'audition, les maladies prolifératives, la cataracte, les transplantations d'organes, les maladies auto-immunes et virales, le cancer et toutes les pathologies caractérisées par une production excessive des ROS et / ou une activation des calpaïnes, et de préférence, les troubles du système nerveux central ou périphérique, les dystrophies musculaires, la cachexie, la perte d'audition et la cataracte.

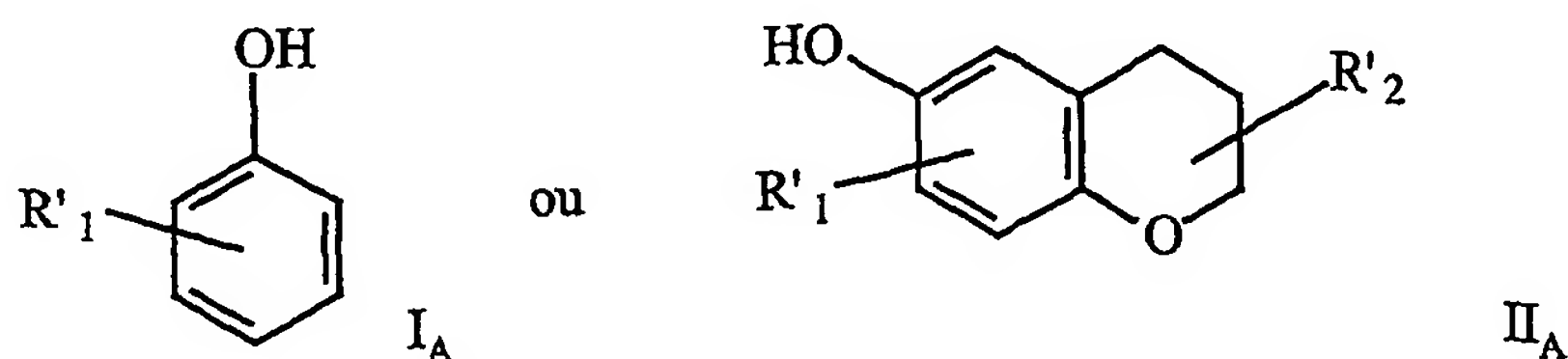
Dans une composition pharmaceutique ou un produit selon l'invention, l'inhibiteur des calpaïnes et le piègeur de formes réactives de l'oxygène peuvent se présenter à des doses qui peuvent être identiques ou différentes. Les dosages sont choisis en fonction des composés associés à des diluants ou excipients appropriés.

L'inhibiteur des calpaïnes et le piègeur de formes réactives de l'oxygène peuvent être administrés de manière simultanée ou séquentielle, par la même voie d'administration ou par des voies différentes. De préférence, les voies d'administration sont orale, parentérale ou topique.

Les piègeurs de formes réactives de l'oxygène peuvent être choisis par exemple parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, la N-acétyl-cystéine, les dérivés du carotène à savoir l' α -, β -, γ - ou δ -carotène et plus particulièrement le β -carotène (Hao Chen et al, Free Radical Biology and Medicine 18 (5), 949-953 (1995)), l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, les ubiquinones telle que le coenzyme Q10 (S. Tereao et al., J. Org. Chem., 44, 868 (1979)) ou les composés captodatifs (H.G. Viehe et al., Acc. Res., 18, 148-154 (1985), incorporée par référence dans la présente demande). Les piègeurs de formes réactives de l'oxygène peuvent également être choisis par exemple parmi les nitrones, les composés phénoliques, des dérivés de l'indole, des indolines, des imidazoles, les phénothiazines, les phénoxazines, les phénazines, les diphenylamines ou des carbazoles, ou bien également parmi les enzymes capables de neutraliser les ou l'une des formes réactives de l'oxygène telles que les superoxydes dismutases, les catalases ou les glutathions peroxydases et leurs mimétiques.

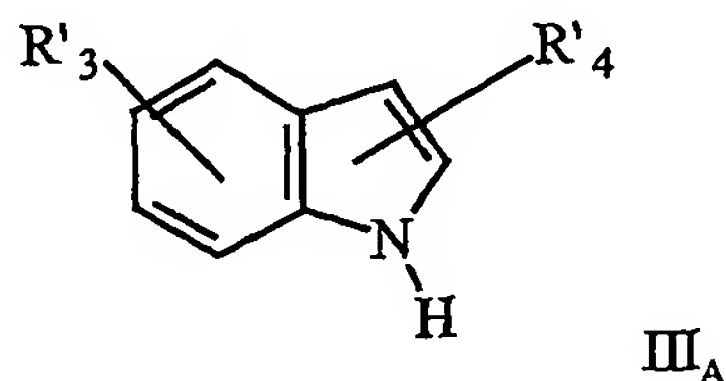
Comme exemples de nitrones piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer les composés tels que définis dans les demandes WO 96/15110, WO 88/05044 et le brevet US 5310916 (incorporés par référence dans la présente demande) mais également le tempol et la N-*tert*-butyl- α -phényl-nitron.

- 5 Parmi les exemples de composés phénoliques piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer le probucol, NDGA, les dérivés du tocophérol à savoir l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, ou les flavonoïdes phénoliques (R. A. et al, Phytochemistry, 27(4), 969-978 (1988), incorporée par référence dans la présente demande). Les composés phénoliques piègeurs des formes réactives de l'oxygène peuvent également être choisis parmi les
- 10 composés de formule générale I_A ou II_A



- dans laquelle R'₁ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux hydroxy, halo, carboxy, alkyle inférieure, alkoxy inférieur, alkényle inférieur ou alkoxy-carbonyle, les radicaux alkyle, alkoxy et alkényles étant éventuellement substitués par un radical hydroxy, halo, carboxy ou amino ; et R'₂
- 15 représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène ou les radicaux alkyle inférieur éventuellement substitué, alkoxy inférieur, hydroxy, halo, amino ou carboxy. De préférence, les composés de formule générale I_A ou II_A sont l'acide 3-5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxy-phénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxy-phénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthyl-phénol, le trolox, le gallate de
- 20 n-propyle, l'eugénole, l'acide caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique et le propofol.

Les dérivés de l'indole piègeurs des formes réactives de l'oxygène, peuvent être des composés tels que définis dans la demande WO 96/26941. Ils peuvent également être des composés de formule générale III_A

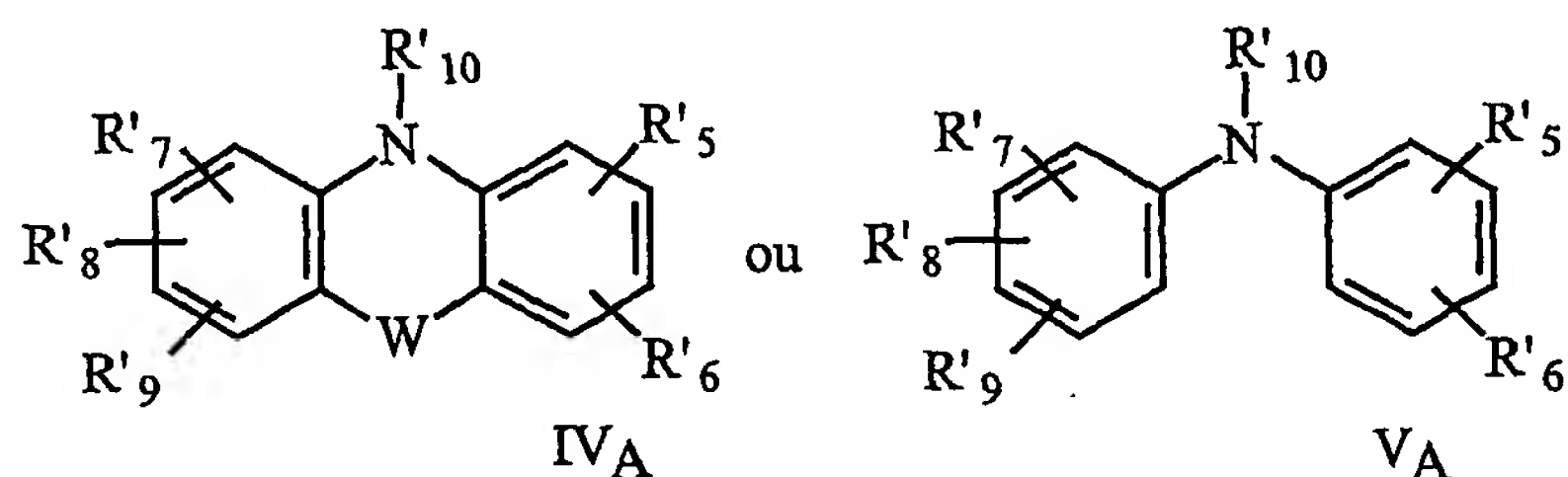


dans laquelle R'₃ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux hydroxy, halo, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ; R'₄ représente un ou plusieurs substituants choisis parmi l'atome d'hydrogène, les radicaux halo, hydroxy, amino, carboxy ou alkylcarbonylaminoalkyle. De préférence, les composés de formule III_A sont la mélatonine, le 5-hydroxy-tryptamine, l'acide 5-hydroxy-indole-2-carboxylique.

Parmi les dérivés de l'indoline piègeurs des formes réactives de l'oxygène, on peut citer la 5-amino-indoline et les N-alkyl-indolines et plus particulièrement la N-méthyl-indoline.

Parmi les imidazoles piègeurs de formes réactives de l'oxygène, on peut citer l'imidazole elle-même ou la cimétidine.

Parmi les inhibiteurs des formes réactives de l'oxygène, on peut également citer les composés de formule IV_A ou V_A



dans lequel R'₅, R'₆, R'₇, R'₈, R'₉ représentent, indépendamment, un atome d'hydrogène, un radical alkyle, alkoxy, cyano, halo, hydroxy, nitro ou -NR'₁₁R'₁₂,

R'₁₁ et R'₁₂ représentent, indépendamment, un atome d'hydrogène, un radical alkyle ou un groupe -COR'₁₃ ou bien R'₁₁ et R'₁₂ forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont rattachés un hétérocycle éventuellement substitué,

R'₁₃ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle, alkoxy ou -NR'₁₄R'₁₅,

R'₁₄ et R'₁₅ représentent, indépendamment, un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, ou bien R'₁₄ et R'₁₅ forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont rattachés un hétérocycle éventuellement substitué,

R'₁₀ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle ou un groupe -COR'₁₆,

R'₁₆ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle, alkoxy ou -NR'₁₇R'₁₈,

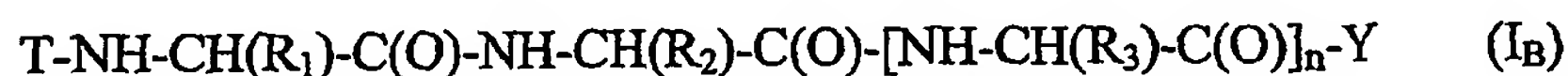
R'₁₇ et R'₁₈ représentent, indépendamment, un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, ou bien R'₁₇ et R'₁₈ forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont rattachés un hétérocycle éventuellement substitué,

W représente une liaison, O ou S ou encore un radical -N(R'₁₉)-, dans lequel R'₁₉
5 représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle.

Comme exemples de carbazoles, on peut citer le carvedilol ou les composés de formule IV_A, et plus particulièrement le 4-hydroxycarbazole. Comme autres exemples de composés de formule IV_A, on peut également citer les phénothiazines et plus particulièrement la 2-méthoxyphénothiazine, les phénoxazines et les phénazines. Comme
10 exemples de composés de formule V_A, on peut citer les diphénylamine telles que la 4-hydroxydiphénylamine, la 4-aminodiphénylamine ou la 4-méthoxy-N-(4-méthoxyphényl)aniline.

L'invention a plus particulièrement pour objet une composition ou produit tel que défini ci-dessus, dans lequel l'inhibiteur de calpaïnes est l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-
15 2-propénoïque (PD150606).

L'invention a plus particulièrement pour objet également une composition ou produit tel que défini ci-dessus, dans lequel l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule I_B



dans laquelle

20 R₁, R₂ et R₃ représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène ou bien un radical alkyle inférieur éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, alkoxy inférieur, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyle, (alkyle inférieur)aminocarbonyle, di(alkyl inférieur)aminocarbonyle, amino, guanidino, aryle éventuellement substitué ou hétéroaryle éventuellement substitué,

25 le ou les substituants des radicaux aryle et hétéroaryle étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical -C(O)-R_y ou -C(O)-O-R'_y dans lequel

R_y représente un radical alkyle inférieur ou -N(R_{y1})(R_{y2}) ;

30 R'_y représente l'atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

Ry₁ et Ry₂ représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi : halo, hydroxy, trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur, amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule -C(O)-O-Rt₁ ou -C(O)-Rt₂ dans laquelle

Rt₁ représente un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

Rt₂ représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

Dans les définitions indiquées ci-dessus, l'expression halo représente le radical fluoro, chloro, bromo ou iodo, de préférence chloro, fluoro ou bromo. Par alkyle, lorsqu'il n'est pas donné plus de précision, ou alkyle inférieur, on entend un radical alkyle linéaire ou ramifié comptant de 1 à 6 atomes de carbone comme, par exemple, les radicaux méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, sec-butyle et tert-butyle, pentyle, néopentyle, isopentyle, hexyle, isohexyle. Les radicaux alkoxy, lorsqu'il n'est pas donné plus de précision, ou alkoxy inférieur peuvent correspondre aux radicaux alkyle indiqués ci-dessus comme par exemple les radicaux méthoxy, éthoxy, propyloxy ou isopropyloxy mais également butoxy linéaire, secondaire ou tertiaire. Le terme alkylthio inférieur désigne de préférence les radicaux dans lesquels le radical alkyle est tel que défini ci-dessus comme par exemple méthylthio, éthylthio.

Par alkényle, lorsqu'il n'est pas donné plus de précision, ou alkényle inférieur, on entend un radical alkyle linéaire ou ramifié comptant de 2 à 6 atomes de carbone et présentant au moins une insaturation (une ou plusieurs double liaison). Comme exemple, on peut citer les groupes vinyle, allyle, propényle, isopropényle, pentényle, butényle, hexanyle, propényle et butadiényle. Le terme cycloalkyle désigne de préférence les cycles cyclopropyle, cyclobutyle, cyclopentyle ou cyclohexyle.

L'expression aryle représente un radical aromatique, constitué d'un cycle ou de cycles condensés, comme par exemple le radical phényle ou naphthyle. Le terme aryloxy désigne de préférence les radicaux dans lesquels le radical aryle est tel que défini ci-dessus comme par exemple le radical phénoxy. L'expression hétéroaryle désigne un radical

aromatique, constitué d'un cycle ou de cycles condensés, avec au moins un cycle contenant un ou plusieurs hétéroatomes identiques ou différents choisis parmi le soufre, l'azote ou l'oxygène. Comme exemple de radical hétéroaryle, on peut citer les radicaux thiényle, furyle, pyrrolyle, imidazolyle, pyrazolyle, isothiazolyle, thiazolyle, isoxazolyle, oxazolyle, pyridyle, pyrazinyle, pyrimidyle, quinolinyle, benzothiényle, benzofuryle et indolyle.

Le terme hétérocycloalkyle représente de préférence un hétérocycle saturé mono ou bicyclique, comportant de 1 à 5 hétéroatomes choisis parmi O, S, N. Comme exemple, on peut citer : tétrahydrofuranne, tétrahydropyranne, oxétane, tétrahydrothiophène, tétrahydrothiopyranne, thiétane, pyrrolidine, pipéridine, azétidine, 1,3-dioxanne, 1,3-dioxolanne, 1,3-dithiolanne, 1,3-dithianne, 1,3-oxathiolanne, 1,3-oxazolidine, 1,3-imidazolidine ou 1,3-thiazolidine.

Le terme arylalkyl (ou aralkyle) désigne un radical dans lequel respectivement les radicaux aryle et alkyle sont tels que définis ci-dessus comme par exemple benzyle, phenéthyle ou naphthylméthyle. Les radicaux alkoxy-carbonyl, (alkyl)aminocarbonyl et (dialkyl)aminocarbonyl désignent les radicaux dans lesquels respectivement les radicaux alkyle et alkoxy ont la signification indiquée précédemment. Les termes alkylcarbonylaminoalkyle, aryloxy alkyle, aryl alkoxy, hétéroaryle alkyle, cycloalkyl alkyle désignent les radicaux dans lesquels les radicaux alkyle, aryloxy, aryle, hétéroaryle et cycloalkyle sont tels que définis ci-dessus.

Dans le cas de radicaux de formule $-NR^iR^j$ où R^i et R^j forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont rattachés un hétérocycle éventuellement substitué, l'hétérocycle est de préférence saturé et comprend de 4 à 7 chaînons et de 1 à 3 hétéroatomes incluant l'atome d'azote déjà présent, les hétéroatomes supplémentaires étant choisis indépendamment dans le groupe constitué des atomes O, N et S. Ledit hétérocycle peut être, par exemple, le cycle azétidine, pyrrolidine, pipéridine, pipérazine, morpholine ou thiomorpholine. Ledit hétérocycle peut être substitué par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi un radical alkyle, alkoxy, aryle, aralkyle, hydroxy ou halo.

Selon la définition des groupes variables, un composé de formule I_B tel que définie ci-dessus, peut présenter un ou plusieurs carbones asymétriques. L'invention concerne les composés de formule I_B telle que définie ci-dessus, composés qui peuvent se trouver sous forme racémiques, énantiomères ou diastéréoisomères.

De manière préférentielle, l'invention a pour objet une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



telle que définie ci-dessus et dans laquelle

- 5 R_1 , R_2 et R_3 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyle, amino, guanidino, ou phényle, indole ou imidazole éventuellement substitué,

- 10 le ou les substituants des radicaux phényle, indole et imidazole étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical $-C(O)-R_y$ ou $-C(O)-O-R'y$ dans lequel

R_y représente un radical alkyle inférieur ou $-N(R_{y1})(R_{y2})$;

$R'y$ représente un radical alkyle inférieur ou benzyle ;

- 15 R_{y1} représente l'atome d'hydrogène et R_{y2} représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi : halo, hydroxy, trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur, amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

- 20 n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ ou $-C(O)-R_{t2}$ dans laquelle

R_{t1} représente un radical alkyle inférieur, benzyle, phénéthyle ;

R_{t2} représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

- 25 De manière très préférentielle, l'invention a pour objet une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



telle que définie ci-dessus et dans laquelle

R_1 et R_2 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un radical phényle, lui même éventuellement substitué par halo, hydroxy ;

Y représente l'atome d'hydrogène ;

- 5 T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ dans laquelle R_{t1} représente un radical alkyle inférieur ou benzyle, et $n = 0$.

L'invention a plus particulièrement pour objet également une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, les nitrones, les composés phénoliques, des dérivés de l'indole, des indolines, des imidazoles, les phénothiazines, les phénoxazines, les phénazines, les diphénylamines ou des carbazoles.

De manière préférentielle, l'invention a pour objet une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, dans lequel le piègeur de formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, le tempol, la N-*tert*-butyl- α -phényl-nitrone, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le probucol, NDGA, l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol, le trolox, le gallate de n-propyle, l'eugénole, l'acide caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique, le propofol, la mélatonine, le 5-hydroxy-tryptamine, l'acide 5-hydroxy-indole-2-carboxylique, la 5-amino-indoline, la N-méthyl-indoline, l'imidazole, la cimétidine, le 4-hydroxy-carbazole, le carvedilol, 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine, la 4-hydroxydiphénylamine, la 4-aminodiphénylamine, la 4-méthoxy-N-(4-méthoxyphényl)aniline ou le 9-[2-(4-morpholinyl)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9*H*-pyrimido [4,5-*b*]indole.

L'invention a plus particulièrement pour objet également une composition ou un produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques, les phénothiazines et les diphénylamines. De manière préférentielle, le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques de formule I_A telle que définie ci-dessus, les phénothiazines de

formule IV_A telle que définie ci-dessus et les diphenylamines de formule V_A telle que définie ci-dessus.

Plus particulièrement également, l'invention a pour objet une composition ou un produit tel que défini ci-dessus et dans lequel

5 le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), la 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine et la 4-hydroxydiphénylamine ; et

le composé inhibiteur de calpaïnes est choisi parmi : (1*S*)-1-({[(1*S*)-1-formyl-3-méthylbutyl]amino}carbonyl)-3-méthylbutylcarbamate de benzyle (ou Z-Leu-
10 Leu-H), (1*S*)-1-{{[(1-benzyl-2-oxoéthyl)amino] carbonyl}-3-méthylbutylcarbamate de benzyle (ou Z-Leu-Phe-H), l'ester benzylique de l'acide [1-[[1-formylpentyl]amino]carbonyl]-3-méthylbutyl]carbamique (calpeptine), et l'acide 3-(4-iodophenyl)-2-mercapto-2-propénoïque (PD 150606).

L'invention a enfin pour objet l'utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et
15 d'une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les troubles du système nerveux central ou périphérique, les dystrophies musculaires, la cachexie, la perte d'audition et la cataracte. De manière préférentielle, la substance inhibitrice des calpaïnes est l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque (PD150606) ou répond à la formule I_B telle que définie
20 ci-dessus. De manière préférentielle également, le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques, les phénothiazines et les diphenylamines, et plus particulièrement, le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques de formule I_A telle que définie ci-dessus, les phénothiazines de formule IV_A telle que définie ci-dessus et les diphenylamines de
25 formule V_A telle que définie ci-dessus.

Les composés inhibiteurs des calpaïnes et piègeurs de formes réactives de l'oxygène sont commerciaux ou peuvent être préparés par les méthodes connues de l'homme de l'art (ou par analogie à ces dernières) (J. Med. Chem. , vol. 37, 2918-2929 (1994) ; TIPS, vol. 11, 139-142 (1990) ; TIBS, vol. 16, 150-153 (1991) ; Br. J. Pharmacol., vol. 110, 369-377
30 (1993)).

Tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans le présent texte ont la signification connue de l'homme de l'art. Par ailleurs, tous les brevets (ou demandes de brevet) ainsi que les autres références bibliographiques sont incorporés par référence.

Partie expérimentale

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doivent en aucun cas être considérés comme une limite à la portée de l'invention.

Soit A le piègeur de formes réactives de l'oxygène et B l'inhibiteur de calpaïnes.

5 Exemple 1

Composé AB, combinaison du composé A : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : Z-Leu-Leu-H, inhibiteur des calpaïnes.

Exemple 2

- 10 Composé AB, combinaison du composé A : 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : Z-Leu-Phe-H inhibiteur des calpaïnes.

Exemple 3

- 15 Composé AB, combinaison du composé A : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B: calpeptine, un inhibiteur de calpaïnes.

Exemple 4

- 20 Composé AB, combinaison du composé A : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque (PD 150606), un inhibiteur de calpaïnes.

Exemple 5

Composé AB, combinaison du composé A : la 4-hydroxydiphénylamine, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque (PD 150606), un inhibiteur de calpaïnes.

25 Exemple 6

Composé AB, combinaison du composé A : la 4-hydroxydiphénylamine, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : Z-Leu-Leu-H, un inhibiteur de calpaïnes.

Exemple 7

Composé AB, combinaison du composé A : la 2-méthoxy-10H-phénothiazine, antioxydant piègeur de radicaux libres oxygénés, et du composé B : calpeptine, un inhibiteur de calpaïnes.

5 Etude pharmacologique

Les composés de l'invention ont été soumis à quelques tests biologiques *in vitro*, afin de prouver leur activité à bloquer la calpaïne et à piéger les radicaux libres. Leur activité a été évaluée sur des tests enzymatiques et sur un modèle de protection de la mort cellulaire. Dans ce modèle, la mort cellulaire par nécrose est induite par la maitotoxine (J Neurochem 1999, 72 (5) : 1853-1863, Mc Ginnis et al). La maitotoxine est une toxine marine qui active les canaux calciques (Biochem. Pharmacol 1990,39:1633-1639, Gusovsky et al). Il en résulte une augmentation de calcium intracellulaire de 10-20 fois dans les cellules gliales de rat C6 (Chem Res Toxicol 1999:12:993-1001, Konoki et al). Le traitement des neuroblastomes humains SHSY5Y par la maitotoxine induit une activation de l'activité de la calpaïne *via* l'augmentation de calcium intracellulaire (Archives of Biochemistry and Biophysics, 331 (2): 208-214, Wang et al). Les calpaïnes sont des cystéines protéases cytosoliques qui ont absolument besoin de calcium pour être activées. Deux isoformes de calpaïnes sont distribuées de façon ubiquitaire dans les tissus : la calpaïne I ou "μ " et la calpaïne II ou "m" qui nécessitent respectivement une concentration μM ou mM de calcium pour être activées.

Dans le modèle *in situ* de nécrose induite par la maitotoxine, une stimulation de la calpaïne et une production de formes réactives de l'oxygène se produit. L'effet partiellement protecteur sur la nécrose d'inhibiteur de calpaïnes ou de piègeur des formes réactives de l'oxygène est démontré. Les effets de l'association ont été comparés à ceux produits par un traitement avec l'inhibiteur de calpaïne ou du piègeur des formes réactives de l'oxygène seul. L'association d'un inhibiteur de calpaïnes et d'un piègeur des formes réactives de l'oxygène montre un effet protecteur significatif sur la nécrose induite par la maitotoxine par rapport à l'effet de l'inhibiteur de calpaïne ou de piègeur des formes réactives pris séparément et aux doses utilisées. Ceci prouve la synergie entre l'inhibiteur de calpaïnes et le piègeur des formes réactives de l'oxygène.

1) Etude des effets sur la Calpaïne I humaine

Le test consiste à mesurer l'activité de l'enzyme (enzyme purifiée à partir d'erythrocytes humains) qui est incubée dans un tampon en présence d'un substrat peptidique couplé à

un fluorochrome (amino -méthylcourmarine, AMC) et du calcium. L'enzyme activée par le calcium, protéolyse le substrat et libère le fragment AMC. L'AMC libéré fluoresce à 460 nm sous une excitation à 380 nm. L'activité de l'enzyme est donc proportionnelle à la quantité de fluorescence c'est à dire de fragment AMC libre. La fluorescence
5 (380/460 nm) est mesurée à l'aide d'un fluorimètre multipuits (Victor 2, Wallac).

Le dosage se fait en micro-plaques 96 puits à fond transparent et paroi noires dans lesquels sont distribués 10 µl par puits de substance à tester dans du DMSO 10 % , 45 µl de mélange réactionnel contenant la calpaïne I humaine à 2,2 U/ml (Calbiochem, ref : 208713), le substrat Suc Leu Tyr-AMC (Bachem, ref : I-1355) à 1,1 mM dans du tampon
10 (Tris-HCl 110 mM; NaCl 110 mM ; EDTA 2,2 mM ; EGTA 2,2 mM ; mercaptoethanol 1,1 mM). La réaction est initiée en ajoutant 45 µl de CaCl₂ 22mM. Pour déterminer le bruit de fond, des puits témoins sans calcium sont ajoutés sur la plaque (10 µL DMSO 10 % + 45 µL de tampon avec l'enzyme et le substrat + 45 µL H₂O). Pour déterminer l'activité totale de l'enzyme des puits témoins sans produit sont ajoutés sur la plaque
15 (10 µL DMSO 10 % + 45 µL de tampon avec l'enzyme et le substrat + 45 µL de CaCl₂ 22 mM). Chaque concentration des produits (0,1 nM à 10 µM) est testée en duplicats. Les plaques sont agitées et l'incubation a lieu pendant une heure à 25° C à l'obscurité. La fluorescence est lue à 380/460 nm à l'aide du Victor.

Les résultats sont exprimés en valeur de CI₅₀ et sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous.

20 2) Effet *in situ* sur l'activité calpaïne dans des neuroblastomes Humains (SHSY5Y) et dans des cellules gliales de rat (C6)

Les neuroblastomes humains SHSY5Y et les cellules gliales de rat C6 sontensemencées à 50 000 et 25 000 cellules, respectivement, par puits dans des plaques à 96 puits dans du DMEM 10 % FBS. Le lendemain, les cellules qui ont adhéré sont lavées 3 fois dans du milieu DMEM sans sérum et 40 mM Hepes. Cent microlitres du produit B sont déposés
25 dans les puits. Après une heure d'incubation à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂, 10 µl contenant le substrat fluorescent de la calpaïne (Suc-Leu-Tyr-AMC) et la maitotoxine (Sigma, ref : M-9159), pour obtenir une concentration finale dans le puits de 100 µM et de 1 nM respectivement, sont rajoutés.

30 Pour déterminer l'activité totale de l'enzyme cellulaire, des puits sans produit sont ajoutés sur la plaque (100 µL DMSO 100^{ème} plus 10 µl de MTX et substrat). Les bruits de fond sont déterminés en rajoutant des puits contrôles sans MTX. Chaque concentration des produits (0,3 µM à 200 µM pour les SHSY5Y et 0,01 µM à 100 µM pour les C6) est testée en triplicats. Les plaques sont agitées, la fluorescence est lue à 380/460 nm à l'aide

du Victor à T zéro. L'incubation a lieu pendant quatre heures pour les SHSY5Y et une heure trente pour les cellules C6 à 30° C à l'obscurité.

Les résultats sont exprimés en valeur de CI₅₀ et sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : activité d'inhibition enzymatique des composés A et B

5

	Inhibition		
	calpaïne I Humaine [CI ₅₀ (nM)]		
	acellulaire	<i>in situ</i> (SHSY5Y) (n = 6)	<i>in situ</i> (C6) (n = 3)
LEUPEPTINE	73		
EXEMPLE 1			
A	-	-	-
B	6	13370 ± 2390	1750 ± 340
EXEMPLE 2			
A	-	-	-
B	8	-	2200 ± 290
EXEMPLE 3			
A	-		
B	2,8		
EXEMPLE 4			
A	-		
B	5144		
EXEMPLE 5			
A	-		
B	5144		
EXEMPLE 6			
A	-		
B	6		
EXEMPLE 7			
A	-		
B	2,8		

(la leupeptine ainsi que les exemples 3 à 7 n'ont été testés que sur l'inhibition de calpaïne I humaine acellulaire).

3) Effet *in vitro* sur la lipoperoxydation lipidique

Le test consiste à induire la peroxydation lipidique par les réactions de Fenton en présence de fer et d'ascorbate. Le degré de peroxydation lipidique est déterminé par la concentration en malonaldehyde (MDA). Le MDA produit par la peroxydation lipidique des acides gras insaturés est un bon indice de la peroxydation lipidique (Esterbauer et al, 5 1990 ; Meth. Enzymol. 186: 407-421). Pour ce test colorimétrique, la condensation d'une molécule de MDA avec deux molécules de réactif chromogène R (N-méthyl-2-phenylindole) produit un chromophore stable dont la longueur d'onde d'absorbance maximale est égale à 586 nm.

- 10 Les membranes sont préparées à partir de cortex de rat mâles Sprague Dawley de 200 à 250 g. Les animaux sont sacrifiés par décapitation et les cerveaux sont immédiatement prélevés et rincés dans du Tris HCl 20 mM pH 7,4 froid. Les cortex, disséqués et débarrassés de la substance blanche, sont alors broyés au potter de Thomas, dans du tampon Tris HCl 20 mM pH 7,4 à 4° C. Le broyat obtenu est centrifugé à faible vitesse 15 pour éliminer les gros débris (515 g pendant 15 minutes à 4° C). Le surnageant est alors réparti dans des tubes de centrifugation en polycarbonate et centrifugé à 51 500 g pendant 25 min à 4° C. Les culots de membranes sont conservés à -80° C.

Le jour de l'expérience, les membranes congelées sont remises en suspension à la concentration de 0,5 équivalents grammes de cortex par 5 ml de tampon Tris HCl 20 mM 20 pH 7,4 et homogénéisées à l'aide d'un combitips. Dans des plaques 96 puits " deep-well" 1 ml polypropylène à fond conique, 5 µl par puits de produit à tester ou du solvant sont mélangés avec 40 µl d'homogénat de cortex cérébral de rat par centrifugation (800 tr/min). Les plaques sont recouvertes d'une feuille d'aluminium autocollante et incubées à 37° C pendant 15 min sous agitation. La réaction de peroxydation lipidique est 25 initiée par réaction de Fenton par l'ajout de 5 µl par puits du mélange de peroxydation contenant de l'EDTA à 1 mM, de l'acide ascorbique à 4 mM et du FeCl₂ à 1 mM, pour former du MDA. Les plaques sont centrifugées brièvement (800 tr/min) et recouvertes d'une feuille d'aluminium autocollante. Après 30 minutes d'incubation à 37° C sous agitation, 160 µl d'un mélange de révélation contenant 3 volumes du réactif 30 chromogène R et un volume de méthanol sont rajoutés par puits. Après une agitation de 10 secondes, 40 µl d'HCl 37 % sont rajoutés par puits. La révélation du MDA formé est obtenue après une incubation des membranes pendant 3/4 h à 45° C.

La séparation des membranes et des surnageants se fait par filtration sous vide sur plaque 96 puits à fond filtrant multiscreen NA (Millipore, ref: MANANLY 50).

L'absorbance des surnageants récupérés dans les plaques 96 puits est lue à l'aide d'un photomètre.

Les résultats sont exprimés en valeur de CI_{50} et sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous.

4) Effet *in situ* sur le taux d'isoprostanes (8-isoPG1F2 α)

- 5 La 8-isoPG1F2 α fait partie d'une famille de composés dont la première étape de synthèse (péroxydation de l'acide arachidonique) se fait de manière non enzymatique en présence de radicaux libres (Morrow et coll, 1990). La mesure des taux de 8-iso PGF2 α est considérée comme un marqueur fiable du stress oxydatif.

- 10 Les cellules gliales de rat C6 ont étéensemencées à 25 000 cellules par puits dans des plaques à 96 puits dans du DMEM 10 % FBS. Le lendemain, 100 μ l du produit A sont déposés dans les puits. Après une heure d'incubation à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂, 10 μ l contenant la maitotoxine, pour obtenir une concentration finale dans le puits de 1 nM, est rajouté. Après 3 heures d'incubation, les surnageants sont prélevés et congelés à -20° C. Les taux de 8-isoPG1F2 α sont mesurés à l'aide d'un kit de dosage EIA
- 15 spécifique (Cayman chemical , réf : 516351).

Les résultats sont exprimés en valeur de CI_{50} (μ M) et sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : activité d'inhibition enzymatique des composés A et B

	Inhibition de la Peroxydation lipidique [CI ₅₀ (μM)]	Inhibition du taux d'isoprostanes <i>in situ</i> (C6) [CI ₅₀ (μM)] (n = 3)
LEUPEPTINE	-	
EXEMPLE 1		
A	3,7	101
B	-	-
EXEMPLE 2		
A	0,19	0,4
B	-	-
EXEMPLE 3		
A	3,7	
B	-	
EXEMPLE 4		
A	3,7	
B	-	
EXEMPLE 5		
A	0,093	
B	-	
EXEMPLE 6		
A	0,093	
B	-	
EXEMPLE 7		
A	0,19	
B	-	

(la leupeptine ainsi que les exemples 3 à 7 n'ont été testés que sur l'inhibition de la peroxydation lipidique).

5) Effet *in vitro* sur la nécrose induite par la maitotoxine

Les neuroblastomes humains SHSY5Y et les cellules gliales de rat C6 sontensemencées à 25 000 cellules par puits dans des plaques à 96 puits dans du DMEM 10 % FBS

pendant 24 h. Les myoblastes de rat L6 sontensemencées à 1000 cellules par puits dans du DMEM 10 % FBS sur des microplaques 96 puits préalablement coatées avec de la gélatine 0,5 % PBS. Après 3 jours de culture le milieu est retiré et remplacé par un milieu de différenciation (DMEM + 10 µg/ml d'insuline +100 µg/ml de transferrine). 50 µl du produit A plus 50 µl de solvant ou 50 µl du produit B sont déposés dans les puits. Après une heure d'incubation à 37° C sous une atmosphère de 5 % de CO₂, 10 µl de maitotoxine pour obtenir une concentration finale de 0,1 à 1 nM (suivant le type cellulaire) est rajouté. Après 3 h d'incubation à 37° C sous une atmosphère de 5 % CO₂, la viabilité cellulaire est déterminée par l'ajout de 10 µl de sels de tétrazolium (wst-1, Roche, réf : 1644807). Les sels de tétrazolium sont clivés en molécules de formazan par des deshydrogénases mitochondriales. La quantité de formazan formé est directement corrélée aux nombres de cellules métaboliquement actives dans la culture. La mesure de l'absorbance du formazan est effectuée à l'aide d'un photomètre multipuits à une longueur d'onde de 420 nm contre une longueur d'onde de référence de 620 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de protection de la nécrose induite par la maitotoxine 0,1 nM et sont résumés dans les tableaux 4 et 5 ci-dessous.

L'effet théorique a été obtenu en multipliant le pourcentage de cellules mortes en présence du produit A par le pourcentage de cellules mortes en présence du produit B (tableau 3). Le pourcentage de protection de la mort cellulaire induite par la MTX étant le pourcentage de cellules maintenues vivantes en présence du ou des produits.

Tableau 3 : Détermination de l'interaction des composés A et B

Fraction Mortes obtenue après combinaison des composés A et B Effet Observé	Fraction Mortes obtenue par chacun des composés A et B Effet théorique	Interactions des composés A et B
FM (A+B) <	(FM A) x (FM B)	synergie
FM (A+B) =	(FM A) x (FM B)	additivité
FM (A+B) >	(FM A) x (FM B)	antagoniste

Dans une première série d'expériences, la concentration du produit A dans l'exemple 1 est fixée (100 µM), le produit B est ajouté à des concentrations variant de zéro à 100 µM (Tableau 4A). Dans une deuxième série d'expériences, le produit B de l'exemple 1 est fixé à 100 µM, le produit A est ajouté à des concentrations variants de zéro à 100 µM

(Tableau 4B). C'est l'association avec 100 μ M de chacun des produits qui montre la plus importante synergie entre le produit A et le produit B pour protéger les cellules SHSY5Y de la nécrose induite par la MTX.

5 **Tableau 4 :** Protection de la nécrose induite par la maitotoxine 0,1 nM sur des neuroblastomes Humains SHSY5Y (n=2)

Tableau 4A : Interaction du composé A (BHT) (concentration fixe à 100 μ M) en présence de concentrations variables du composé B (Z-Leu-Leu-H).

	Protection de la nécrose induite par MTX				
	A	B			
	100 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
Composé A (100 μ M)	8,68 \pm 0,3				
Composé B		6,89 \pm 1,51	6,94 \pm 0,2	9,01 \pm 0,83	17,52 \pm 2,69
Composé A + Composé B		24,90 \pm 0,93	32 \pm 0,93	35,74 \pm 5,71	44,07 \pm 16,62
Effet observé					
composé A + composé B		14,98 \pm 1,1	15,01 \pm 0,46	16,91 \pm 1,03	24,68 \pm 2,2
Effet théorique					

10 **Tableau 4B :** Interaction du composé B (Z-Leu-Leu-H) fixe (100 μ M) en présence de concentrations variables du composé A (BHT).

	Protection de la nécrose induite par MTX				
	B	A			
	100 μ M	12,5 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
composé B (100 μ M)	17,52 \pm 2,69				
composé A		5,18 \pm 1,81	7,45 \pm 1,65	8,87 \pm 0,34	8,68 \pm 0,3
composé A + composé B		22,08 \pm 4,49	27,38 \pm 2,46	30,71 \pm 11,01	44,07 \pm 16,62
Effet observé					
composé A + composé B		21,83 \pm 1,06	23,7 \pm 1,13	24,82 \pm 2,73	24,68 \pm 2,2
Effet théorique					

Au vu des résultats précédents, l'association de l'exemple 1 avec du produit A et du produit B à 100 µM de chacun des produits est effectuée sur les neuroblastomes humains (SHSY5Y ; Tableau 5A) et sur les cellules gliales avec 25 µM de produit A et 50 µM de produit B (C6 ; Tableau 5B) sur un plus grand nombre de cas.

5 Tableaux 5 : Interaction synergique des composés A et B sur la protection de la nécrose.

Tableau 5A :

Produit à 100 µM	Protection de la nécrose induite par MTX sur SHSY5Y (n = 8)
EXEMPLE 1	
A	19,48 ± 5,20 %
B	12,87 ± 3,72 %
AB observé	40,35 ± 6,21% */ A, **/B, supérieur au théorique
AB théorique	28,69 ± 6,73 %

Les résultats du Tableau 5A, Exemple 1 montrent que le Z-Leu-Leu-H inhibiteur des calpaïnes, utilisé à la concentration de 100 µM, est inactif pour protéger efficacement les neuroblastomes Humains (SHSY5Y) de la nécrose induite par la maitotoxine. De même, l'acide 3-5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque utilisé comme piègeur des formes réactives de l'oxygène à la dose de 100 µM est faiblement actif (inférieur à 20 %). Par contre, l'association des deux composés protège significativement par rapport aux deux composés testés séparément. Cet effet est synergique, car le pourcentage de protection obtenue en associant les deux composés est supérieur à l'effet théorique calculé (Tableaux 3 et 5A, Exemple 1).

Tableau 5B :

Produits	Protection de la nécrose induite par MTX sur C6 ^(a)
<u>EXEMPLE 1</u>	
B [50µM]	9,69 %
A [25µM]	21,23 %
A[50µM]B[25µM] observé	43,95 %
AB théorique	28,59 %
<u>EXEMPLE 2</u>	
A [50µM]	6,56 ± 1,6 %
B [50µM]	12,05 ± 2,82 %
A[50µM]B[50µM] observé	33,06 ± 7,99 %
AB théorique	17,77 ± 3,68 %
<u>EXEMPLE 3</u>	
B [100 µM]	0,84 %
A [50 µM]	12,51 %
A[100µM]B[50 µM] observé	37,77 %
AB théorique	13,25 %
<u>EXEMPLE 4</u>	
B [100 µM]	0,36 %
A [100 µM]	30,84 %
A[100µM]B[100 µM] observé	60,90 %
AB théorique	31,09 %
B [100 µM]	2,75 %
A [25 µM]	16,17 %
A[25µM]B[100 µM] observé	27,15 %
AB théorique	18,47 %
<u>EXEMPLE 5</u>	
B [25 µM]	0,69 %
A [100 µM]	17,90 %
A[25µM]B[100 µM] observé	29,73 %
AB théorique	18,47 %
<u>EXEMPLE 6</u>	
B [50 µM]	4,91 %
A [100 µM]	9,43 %
A[50µM]B[100 µM] observé	31,21 %
AB théorique	13,88 %
<u>EXEMPLE 7</u>	
B [50 µM]	13,03 %
A [100 µM]	10,45 %
A[50µM]B[100 µM] observé	62,09 %
AB théorique	22,12 %

^(a) n = 1 pour les exemples 1 et 3 à 7 et n = 3 pour l'exemple 2)

De même que pour le Tableau 5A, les résultats du Tableau 5B, Exemple 1 montrent que le Z-Leu-Leu-H inhibiteur des calpaïnes, utilisé à la concentration de 50 μ M, est inactif pour protéger efficacement les cellules gliales de rat (C6) de la nécrose induite par la maitotoxine. De même, l'acide 3-5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque utilisé comme
5 piégeur des formes réactives de l'oxygène à la dose de 25 μ M est faiblement actif (de l'ordre de 20 %). Par contre, l'association des deux composés protège par rapport aux deux composés testés séparément (43 %). Cet effet est synergique, car le pourcentage de protection obtenue en associant les deux composés est supérieur à l'effet théorique calculé (Tableaux 3 et 5B, Exemple 1).

- 10 L'effet synergique d'un anti-ROS et d'un anti-calpaïne sur la protection de la nécrose induite par la MTX a été vérifié sur les cellules gliales avec un autre antioxydant et un autre inhibiteur de calpaïne (Exemple 2, Tableau 5B).

De la même façon, le 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine, antioxydant piégeur de radicaux libres oxygénés, et le Z-Leu-Phe-H, inhibiteur des calpaïnes sont inactifs à la dose de
15 50 μ M pour protéger les cellules gliales de rat (C6) de la nécrose induite par la maitotoxine. Par contre, l'association du 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine avec Z-Leu-Phe-H (Tableau 5B, Exemple 2) montre une protection hautement significative par rapport aux deux composés testés séparément ainsi qu'à l'association théorique. Cet effet est significativement synergique, car le pourcentage de protection obtenue en associant
20 les deux composés est significativement supérieur à l'effet théorique calculé (Tableaux 3 et 5B).

L'effet synergique d'autres antioxydants et d'autres inhibiteurs de calpaïne a également été testé sur les cellules gliales (Exemples 3 à 7 ; Tableau 5B). L'exemple 7 a été reproduit sur une autre lignée cellulaire notamment des cellules musculaires squelettiques
25 de rat (myoblastes différenciées en myotubes ; Tableau 5C). Dans ces exemples, les produits A et B sont peu protecteurs par eux-mêmes vis à vis de la nécrose cellulaire induite par la maitotoxine, par contre, l'association des deux composés protège par rapport aux deux composés testés séparément. Ces effets sont synergiques, car le pourcentage de protection obtenue en associant les deux composés est supérieur à l'effet
30 théorique calculé (Tableaux 3, 5B Exemples 3 à 7 et 5C Exemple 7).

Tableau 5C :

Produits	Protection de la nécrose induite par MTX sur L6 Myoblastes différenciées en myotubes (cellules du muscle squelettique de rat)
<u>EXEMPLE 7</u>	
B [100 μ M]	5,09 %
A [100 μ M]	10,94 %
A [100 μ M] B [100 μ M] observé	25,05 %
AB théorique	15,48 %

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.

5 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, et éventuellement un support pharmaceutiquement acceptable.

3. Composition selon l'une des revendications 1 à 2 caractérisée en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)

10
$$T-NH-CH(R_1)-C(O)-NH-CH(R_2)-C(O)-[NH-CH(R_3)-C(O)]_n-Y \quad (I_B)$$

dans laquelle

15 R_1 , R_2 et R_3 représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène ou bien un radical alkyle inférieur éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, alkoxy inférieur, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyle, (alkyle inférieur)aminocarbonyle, di(alkyl inférieur)aminocarbonyle, amino, guanidino, aryle éventuellement substitué ou hétéroaryle éventuellement substitué,

le ou les substituants des radicaux aryle et hétéroaryle étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical $-C(O)-R_y$ ou $-C(O)-O-R'y$ dans lequel

20 R_y représente un radical alkyle inférieur ou $-N(R_{y1})(R_{y2})$;

$R'y$ représente l'atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

25 R_{y1} et R_{y2} représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi : halo, hydroxy,

trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur, amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ ou $-C(O)-R_{t2}$ dans laquelle

5 R_{t1} représente un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

R_{t2} représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'inhibiteur de calpaines répond à la formule (I_B)

10
$$T-NH-CH(R_1)-C(O)-NH-CH(R_2)-C(O)-[NH-CH(R_3)-C(O)]_n-Y \quad (I_B)$$

dans laquelle

R_1 , R_2 et R_3 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyl, amino, guanidino, ou phényle, indole ou imidazole
15 éventuellement substitué,

le ou les substituants des radicaux phényle, indole et imidazole étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical $-C(O)-R_y$ ou $-C(O)-O-R'y$ dans lequel

R_y représente un radical alkyle inférieur ou $-N(R_{y1})(R_{y2})$;

20 $R'y$ représente un radical alkyle inférieur ou benzyle ;

R_{y1} représente l'atome d'hydrogène et R_{y2} représente, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents
25 choisis parmi : halo, hydroxy, trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur, amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ ou $-C(O)-R_{t2}$ dans laquelle

R_{t1} représente un radical alkyle inférieur, benzyle, phénéthyle ;

R_{t2} représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

- 5 5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



dans laquelle

- 10 R_1 et R_2 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un radical phényle, lui même éventuellement substitué par halo, hydroxy ;

Y représente l'atome d'hydrogène ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ dans laquelle R_{t1} représente un radical alkyle inférieur ou benzyle, et $n = 0$.

- 15 6. Composition selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que l'inhibiteur de calpaïnes est l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque.

7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, les nitrones, les composés
20 phénoliques, des dérivés de l'indole, des indolines, des imidazoles, les phénothiazines, les phénoxazines, les phénazines, les diphenylamines ou des carbazoles.

8. Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, le tempol, la N-*tert*-butyl- α -phényl-nitrone, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide
25 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le probucol, NDGA, l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol, le trolox, le gallate de n-propyle, l'eugénole, l'acide caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique, le propofol, la
30 mélatonine, le 5-hydroxy-tryptamine, l'acide 5-hydroxy-indole-2-carboxylique, la

5-amino-indoline, la N-méthyl-indoline, l'imidazole, la cimétidine, le 4-hydroxy-carbazole, le carvedilol, 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine, la 4-hydroxydiphénylamine, la 4-aminodiphénylamine, la 4-méthoxy-N-(4-méthoxyphényl) aniline ou le 9-[2-(4-morpholiny)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9H-pyrimido [4,5-*b*]indole.

- 5 9. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques, les phénothiazines et les diphénylamines.

10. Composition selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que

- 10 le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), la 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine et la 4-hydroxydiphénylamine ; et

- 15 le composé inhibiteur de calpaïnes est choisi parmi : (1*S*)-1-([(1*S*)-1-formyl-3-méthylbutyl]amino)carbonyl)-3-méthylbutylcarbamate de benzyle, (1*S*)-1-([(1-benzyl-2-oxoéthyl)amino] carbonyl)-3-méthylbutylcarbamate de benzyle, l'ester benzylique de l'acide [1-[[1-formylpentyl]amino]carbonyl]-3-méthylbutyl] carbamique (calpeptine), et l'acide 3-(4-iodophenyl)-2-mercapto-2-propénoïque.

- 20 11. Produit comprenant au moins une substance inhibitrice des calpaïnes et au moins une substance piègeur de formes réactives de l'oxygène en tant que produit de combinaison, sous forme séparée, pour une utilisation simultanée ou séquentielle dans le traitement de pathologies dans lesquelles les calpaïnes et les formes réactives de l'oxygène sont impliquées, pathologies telles que les maladies inflammatoires et immunologiques, les maladies cardio-vasculaires et cérébro-vasculaires, les troubles du système nerveux central, l'ostéoporose, les dystrophies musculaires, la cachexie, la perte d'audition, les maladies prolifératives, la cataracte, les transplantations d'organes, les maladies auto-immunes et virales, le cancer et toutes les pathologies caractérisées par une production excessive des ROS et / ou une activation des calpaïnes.

12. Produit selon la revendication 11 dans le traitement les troubles du système nerveux central ou périphérique, les dystrophies musculaires, la cachexie, la perte d'audition, la cataracte.

- 30 13. Produit selon l'une des revendications 11 à 12, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



dans laquelle

R_1 , R_2 et R_3 représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène ou bien un radical alkyle inférieur éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, alkoxy inférieur, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyle, (alkyle inférieur)aminocarbonyle, di(alkyl inférieur)aminocarbonyle, amino, guanidino, aryle éventuellement substitué ou hétéroaryle éventuellement substitué,

le ou les substituants des radicaux aryle et hétéroaryle étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical $-C(O)-R_y$ ou $-C(O)-O-R'y$ dans lequel

R_y représente un radical alkyle inférieur ou $-N(R_{y1})(R_{y2})$;

$R'y$ représente l'atome d'hydrogène ou un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

R_{y1} et R_{y2} représentent, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi : halo, hydroxy, trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur, amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ ou $-C(O)-R_{t2}$ dans laquelle

R_{t1} représente un radical alkyle inférieur ou arylalkyle inférieur ;

R_{t2} représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

14. Produit selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



dans laquelle

R_1 , R_2 et R_3 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : hydroxy, mercapto, alkylthio inférieur, carboxy, aminocarbonyl, amino, guanidino, ou phényle, indole ou imidazole éventuellement substitué,

- 5 le ou les substituants des radicaux phényle, indole et imidazole étant choisis parmi : halo, hydroxy, alkyle inférieur ou alkoxy inférieur ;

Y représente l'atome d'hydrogène ou un radical $-C(O)-R_y$ ou $-C(O)-O-R'y$ dans lequel

R_y représente un radical alkyle inférieur ou $-N(R_{y1})(R_{y2})$;

$R'y$ représente un radical alkyle inférieur ou benzyle ;

- 10 R_{y1} représente l'atome d'hydrogène et R_{y2} représente, indépendamment, l'atome d'hydrogène, un radical alkyle inférieur, alkoxy inférieur, arylalkyle inférieur, hétéroarylalkyle inférieur, cycloalkyl-alkyle, hétérocycloalkyle, ces radicaux pouvant être substitués par un ou plusieurs substituants identiques ou différents choisis parmi : halo, hydroxy, trifluorométhyle, alkyle inférieur, alkoxy inférieur,
- 15 amino, (alkyl inférieur)amino, di(alkyl inférieur)amino, aryloxy, arylalkoxy ;

n représente 0 ou 1 ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ ou $-C(O)-R_{t2}$ dans laquelle

R_{t1} représente un radical alkyle inférieur, benzyle, phénéthyle ;

- 20 R_{t2} représente un radical alkyle inférieur, arylalkyle inférieur, aryloxy alkyle inférieur ou un hétéroaryle.

15. Produit selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes répond à la formule (I_B)



dans laquelle

- 25 R_1 et R_2 représentent, indépendamment, un radical alkyle éventuellement substitué par un radical phényle, lui même éventuellement substitué par halo, hydroxy ;

Y représente l'atome d'hydrogène ;

T représente un radical de formule $-C(O)-O-R_{t1}$ dans laquelle R_{t1} représente un radical alkyle inférieur ou benzyle, et $n = 0$.

16. Produit selon l'une des revendications 11 à 12, caractérisé en ce que l'inhibiteur de calpaïnes est l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque.
- 5 17. Produit selon l'une des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, les nitrones, les composés phénoliques, des dérivés de l'indole, des indolines, des imidazoles, les phénothiazines, les phénoxazines, les phénazines, les diphenylamines ou des carbazoles.
- 10 18. Produit selon l'une des revendications 11 à 17, caractérisé en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi l'acide ascorbique, l'éthoxyquin, le tempol, la N-*tert*-butyl- α -phényl-nitrone, la N-acétyl-cystéine, le β -carotène, l'acide 2,2,5,5-tétraméthyl-3-pyrroline-1-oxyl-3-carboxylique, le coenzyme Q10, les composés captodatifs, le probucol, NDGA, , l' α -, β -, γ -, ϵ -, τ - ou δ -tocophérol, l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque, le 2,3,6-triméthyl-2-hexyloxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthoxyphénol, le 2,6-di-*tert*-butyl-4-méthylphénol, le trolox, le gallate de n-propyle, l'eugénole, l'acide caféique, l'acide sinapinique, l'acide gallique, le propofol, la mélatonine, le 5-hydroxy-tryptamine, l'acide 5-hydroxy-indole-2-carboxylique, la
- 15 5-amino-indoline, la N-méthyl-indoline, l'imidazole, la cimétidine, le 4-hydroxy-carbazole, le carvedilol, 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine, la 4-hydroxydiphénylamine, la 4-aminodiphénylamine, la 4-méthoxy-N-(4-méthoxyphényl) aniline ou le 9-[2-(4-morpholinyl)éthyl]-2,4-di-1-pyrrolidinyl-9*H*-pyrimido [4,5-*b*]indole.
- 20 19. Produit selon l'une des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques, les phénothiazines et les diphenylamines.
- 25 20. Produit selon l'une des revendications 11 à 12, caractérisé en ce que
- le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi : l'acide 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoïque (BHT), la 2-méthoxy-10*H*-phénothiazine et la
- 30 4-hydroxydiphénylamine ; et
- le composé inhibiteur de calpaïnes est choisi parmi : (1*S*)-1-({[(1*S*)-1-formyl-3-méthylbutyl]amino}carbonyl)-3-méthylbutylcarbamate de benzyle, (1*S*)-

1-{{{(1-benzyl-2-oxoéthyl)amino} carbonyl}-3-méthylbutylcarbamate de benzyle, l'ester benzylique de l'acide [1-[[[1-formylpentyl)amino]carbonyl]-3-méthylbutyl] carbamique (calpeptine), et l'acide 3-(4-iodophenyl)-2-mercapto-2-propénoïque.

21. Utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et d'une substance piègeur des
5 formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les dystrophies musculaires.

22. Utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter la cachexie.

10 23. Utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter la perte d'audition.

24. Utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter la
15 cataracte.

25. Utilisation d'une substance inhibitrice des calpaïnes et une substance piègeur des formes réactives de l'oxygène, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter les troubles du système nerveux central.

26. Utilisation selon l'une des revendications 21 à 25, caractérisée en ce que la substance
20 inhibitrice des calpaïnes est l'acide 3-(4-iodophényl)-2-mercapto-2-propénoïque (PD150606) ou répond à la formule I_B telle que définie à la revendication 3.

27. Utilisation selon l'une des revendications 21 à 26, caractérisée en ce que le piègeur des formes réactives de l'oxygène est choisi parmi les composés phénoliques, les phénothiazines et les diphenylamines.